Revue suisse Zool.	Tome 95	Fasc. 3	p. 621-629	Genève, septembre 1988

Différenciation enzymatique pendant le développement chez *Solea vulgaris* (Quensel) [1]

par

F. BASAGLIA *, P. FERIOLI *, A. SANTULLI **, V. D'AMELIO * et G. SALVATORELLI ***

Avec 6 figures et 1 tableau

ABSTRACT

Differentiation of some enzymatic patterns during development in *Solea vulgaris*. — A study was made of the evolution of enzymatic patterns of ADH, α-GPDH, LDH, MDH, G-6-PD and GPI during development in *Solea vulgaris*.

The biochemical characterization was done with the electrophoretic method on starch gel, and the isozymes were revealed with specific histochemical staining.

The spatial and temporal ontogenetic variations have been related to genetic factors of repression, regulation and expression, as well as metabolic, morphological and environmental factors.

INTRODUCTION

Pendant la différenciation cellulaire on peut remarquer une progressive activation des gènes qui règlent la synthèse, la distribution dans les différents tissus, l'activité et la dégradation des divers enzymes (SHAKLEE *et al.* 1974; PHILIPP *et al.* 1979, 1983; GRACY 1982; SCANDALIOS 1983; WHITT 1984; PASDAR *et al.* 1984; FRANKEL 1985; COPPES 1986).

---

[1] Poster présenté à l'Assemblée annuelle de la SSZ à Lucerne, les 8 et 9 octobre 1987.

* Istituto di Anatomia Comparata, Università di Ferrara, V. Luigi Borsari 46, 44100 Ferrara, Italia.

** Istituto di Biologia Marina, Libera Università di Trapani, Piazza Scarlatti, 91100 Trapani, Italia.

*** Istituto di Istologia ed Embriologia, Università di Palermo, V. Archirafi 18, 90123 Palermo, Italia.

Afin d'essayer de mieux connaître ces phénomènes pendant le développement des poissons, nous nous sommes proposés d'étudier chez *Solea vulgaris* (Quensel) la variabilité ontogénétique des différents enzymes en utilisant les techniques de l'électrophorèse sur gel d'amidon. Nous avons pris en examen six systèmes enzymatiques correspondant à onze loci genici dans neuf différents stades du développement embryonnaire et larvaire de la sole.

TABLEAU 1.

Méthodes utilisées pour la séparation et la détection des protéines.
Coloration histochimique: *LDH:* WHITT *1970; les autres enzymes selon* PHILIPP et al. *1979.*

MÉTHODES ÉLECTROPHORÈTIQUES	COLORATIONS HISTOCHIMIQUES
TRIS-CITRATE (TC) (SYNER et GOODMAN 1966) Les gels sont composés par 12% d'amidon (p/v) en 0.12 M Tris/0.0037 M citrate, pH 7. Dans les cuves le tampon est composé par 750 ml de 0.378 M Tris/0.141 M citrate, pH 6. L'électrophorèse a été pratiquée à 20 volts/cm pendant 2 h et 30′ à 4° C.	**ADH** 50 ml 0.2 M Tris-HCl, pH 8.0, 1.5 ml 95% éthanol, 7.5 mg NAD, 3.5 mg NBT, 3.5 mg PMS. **LDH** 50 ml 0.2 M Tris-HCl, pH 8.0, 12 ml 1.0 M lithium lactate, pH 7.0, 7.5 mg NAD, 3.5 mg NBT, 3.5 mg PMS.
TRIS-CITRATE (TC) Les gels sont composés par 14% d'amidon (p/v) en 0.075 M Tris/0.025 M citrate, pH 6.9. Dans les cuves le tampon est composé par 750 ml de 0.15 M Tris/0.005 M citrate, pH 6.9. L'électrophorèse a été pratiquée à 20 volts/cm pendant 5 h et 30′ à 4° C.	**MDH** 50 ml 0.2 M Tris-HCl, pH 9.0, 5.0 ml 10 M sodium malate, pH 7.0, 7.5 mg NAD, 3.5 mg NBT, 3.5 mg PMS.
TRIS-CITRATE/NaOH-BORATE (POULIK 1957; CALLEGARINI 1966) Les gels sont composés par 13% d'amidon (p/v) en 0.076 M Tris/0.05 M citrate, pH 8.6. Dans les cuves le tampon est composé par 750 ml de 0.5 M NaOH/0.3 M borate, pH 8.6. L'électrophorèse a été pratiquée à 25 volts/cm pendant 2 h et 30′ à 4° C.	**α-GPDH** 50 ml 0.2 M Tris-HCl, pH 8.0, 25 ml DL-α glycérophosphate, 7.5 mg NAD, 3.5 mg NBT, 3.5 mg PMS. **G-6-PD** 50 ml 0.2 M Tris-HCl, pH 8.0, 20 mg glucose-6-phosphate, 5 mg NADP, 3.5 mg NBT, 3.5 mg PMS. **GPI** 50 ml 0.2 M Tris-HCl, pH 8.0, 40 mg fructose-6-phosphate, 40 mg ($MgCl_2$), 15 unités de glucose-6-phosphate déshydrogénase, 10 mg NADP, 3.5 mg NBT, 3.5 mg PMS.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les embryons, les larves et les exemplaires adultes provenaient de l'élevage «Ittica Stagnone» de Marsala (Sicile).

La température de l'eau de mer du vivier était maintenue à 15°. Un nombre variable d'exemplaires (entre six et vingt) selon les différents stades examinés ont été homogénéisés dans 0.05 ml de tampon 0.1 M Tris-HC1 à pH 7 et les échantillons étaient conservés à −20° jusqu'au moment de leur utilisation.

Pour la préparation des organes et des tissus de l'adulte, pris comme témoin, nous avons appliqué la technique mise au point par CALLEGARINI & RICCI (1973). Par la suite, les échantillons ont été dégelés et centrifugés à 6000× g pendant 30 min à 4° C.

La détermination de l'activité enzymatique totale et les études des isoenzymes, à partir du liquide surnageant, ont été faites par électrophorèse sur gel d'amidon suivie par des colorations histochimiques spécifiques pour les différents systèmes enzymatiques considérés (tableau 1).

RÉSULTATS

1) *Alcool déshydrogénase* (ADH, EC 1.1.1.1)

Cet enzyme codifié par un seul locus genicus (PHILIPP *et al.* 1979; STAN TSAI *et al.* 1987) n'a pas été mis en évidence ni pendant le développement embryonnaire ni dans le tissu hépatique chez l'adulte où normalement il exprime son activité maximale.

2) *Glycerol-3-phosphate déshydrogénase* (α-GPDH, EC 1.1.1.8)

Cet enzyme codifié par deux loci genici, α-G*pdh*-A et α-G*pdh*-B (PHILIPP *et al.* 1979) et dont l'isoenzyme α-GPDH-A est actif dans le muscle squelettique et l'isoenzyme α-GPDH-B dans le foie dans la plupart des téléostéens n'est décelable ni pendant le développement ni dans les tissus chez l'adulte.

3) *Lactate déshydrogénase* (LDH, EC 1.1.1.27)

Il s'agit d'un tétramère codifié chez la plupart des téléostéens par trois loci genici, L*dh*-A, L*dh*-B, L*dh*-C (PHILIPP *et al.* 1979, 1983; WHITT 1984).

Chez *Solea vulgaris* sont actifs seulement les deux loci genici L*dh*-A et L*dh*-B.

Au dix-septième jour, l'hétérotétramère A_2B_2 est déjà décelable et au vingt-cinquième jour, l'hétérotétramère A_3B_1 et ces deux isoenzymes expliquent leur activité la plus intense au quarante-cinquième jour. Mais ce n'est que chez l'adulte que les homotétramères A_4 et B_4 deviennent actifs (figs 1 et 2).

4) *Malate déshydrogénase* (MDH, EC 1.1.1.37)

Cet enzyme est un dimère codifié par trois loci genici, M*dh*-M, M*dh*-A, M*dh*-B (PHILIPP *et al.* 1979, 1983).

Dans l'œuf vierge on peut mettre en évidence tous les trois isoenzymes MDH-Mt, MDH-A_2, MDH-B_2. Un jour après la fécondation est actif seulement le MDH-A_2 et au dix-septième jour le MDH-B_2.

Chez les larves plus âgées, tous les trois isoenzymes sont à nouveau actifs. Il faut aussi remarquer que dans tous les tissus chez l'adulte, l'isoenzyme B_2 est dominant tandis que l'isoenzyme A_2 d'origine maternelle, n'est plus décelable dans les tissus (figs 3 et 4).

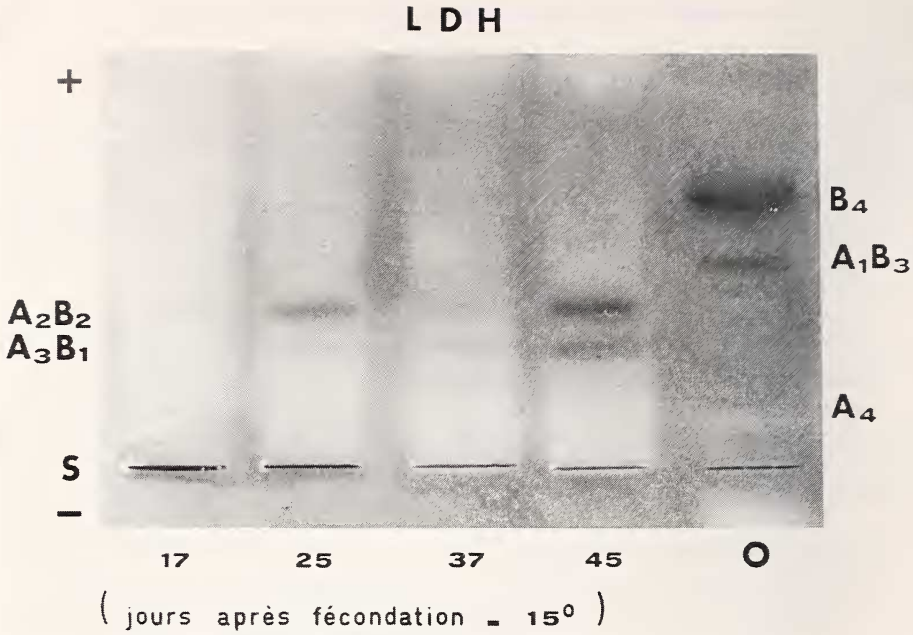

FIG. 1.

Zymogrammes des isoenzymes de la lactate déshydrogénase chez *S. vulgaris* sur gel d'amidon. O: œil. S: lieu d'insertion des échantillons.

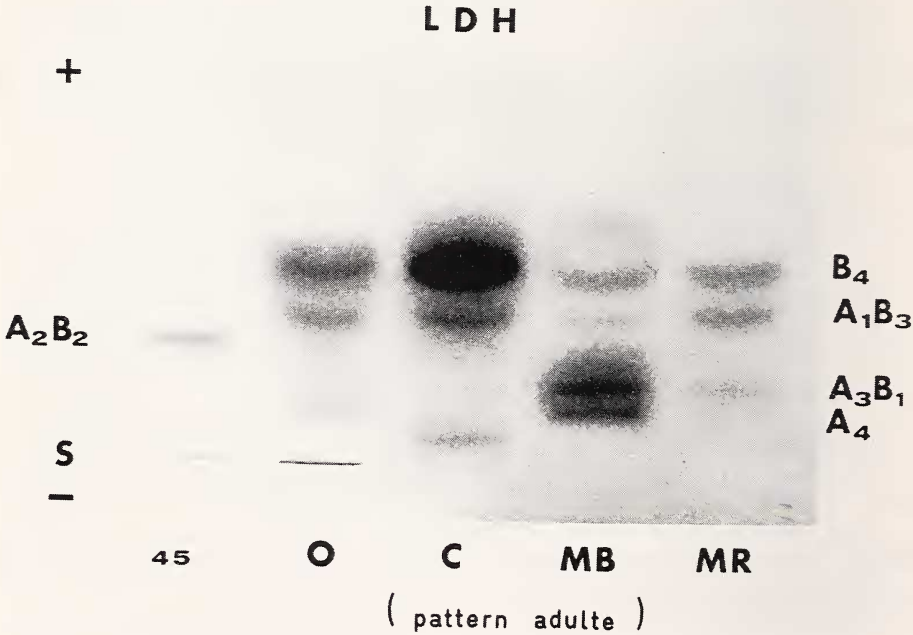

FIG. 2.

Zymogrammes des isoenzymes de la lactate déshydrogénase chez *S. vulgaris* sur gel d'amidon. O: œil; C: cœur; MB: muscle blanc; MR: muscle rouge. S: lieu d'insertion des échantillons.

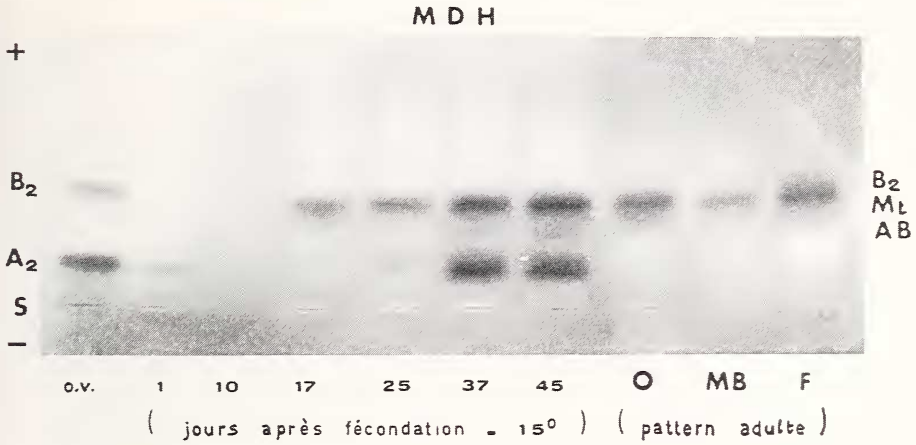

FIG. 3.

Zymogrammes des isoenzymes de la malate déshydrogénase chez *S. vulgaris* sur gel d'amidon. o.v.: œuf vierge; O: œil; MB: muscle blanc; F: foie. S: lieu d'insertion des échantillons.

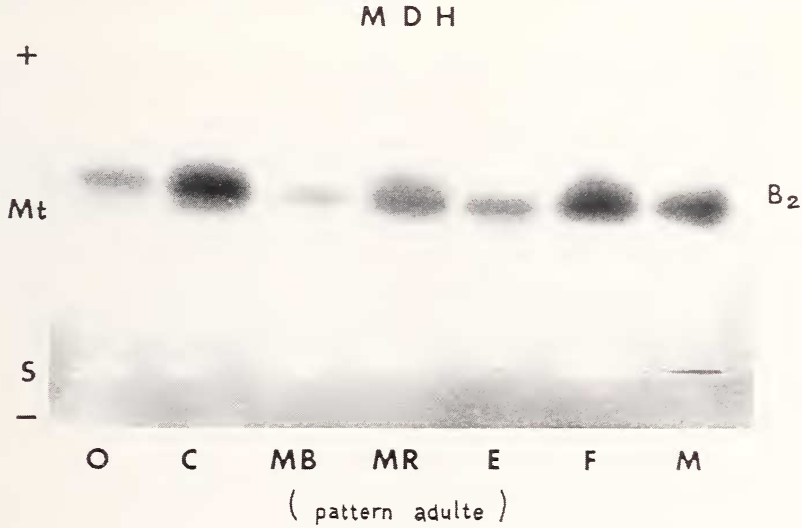

FIG. 4.

Zymogrammes des isoenzymes de la malate déshydrogénase chez *S. vulgaris* sur gel d'amidon. O: œil; C: cœur; MB: muscle blanc; MR: muscle rouge; E: encéphale; F: foie; M: mésonéphros. S: lieu d'insertion des échantillons.

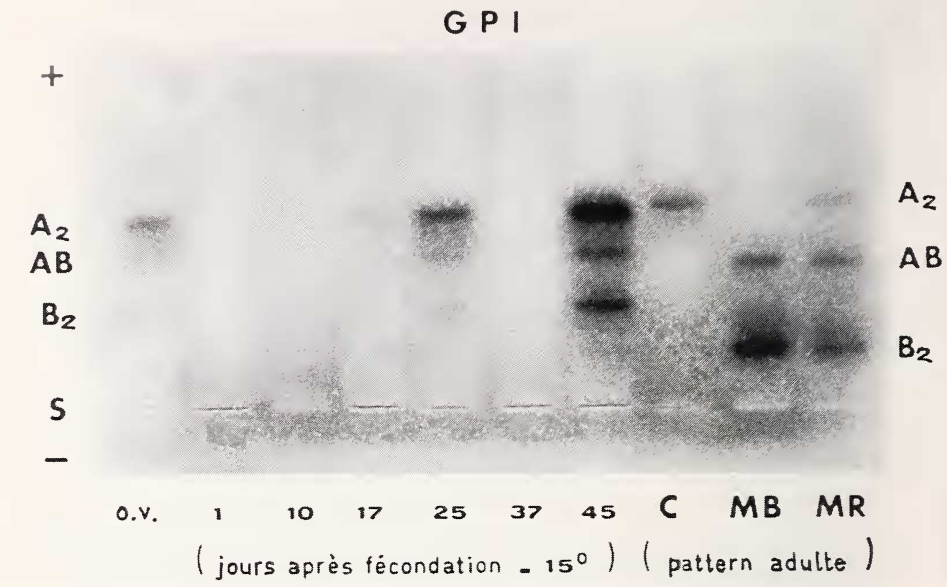

FIG. 5.

Zymogrammes des isoenzymes de la glucose-phosphate-isomérase chez *S. vulgaris* sur gel d'amidon. o.v.: œuf vierge; C: cœur; MB: muscle blanc; MR: muscle rouge. S: lieu d'insertion des échantillons.

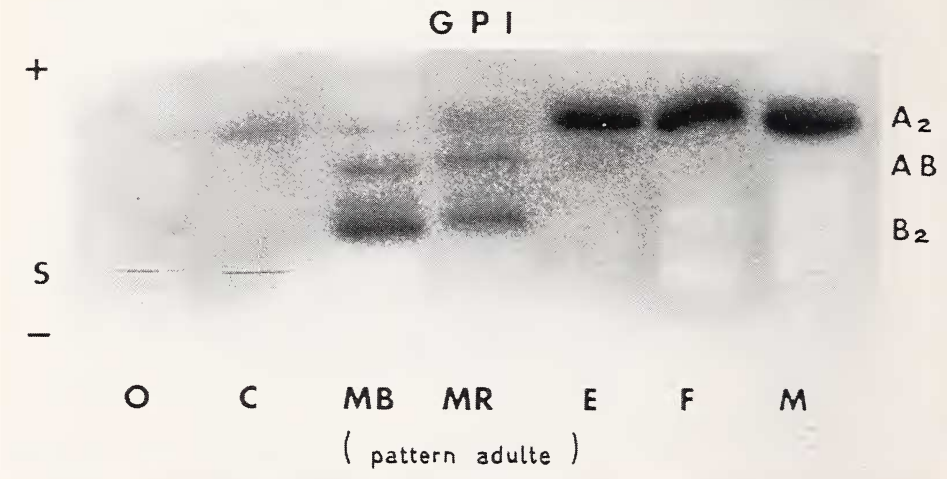

FIG. 6.

Zymogrammes des isoenzymes de la glucose-phosphate-isomérase chez *S. vulgaris* sur gel d'amidon. O: œil; C: cœur; MB: muscle blanc; MR: muscle rouge; E: encéphale; F: foie; M: mésonéphros. S: lieu d'insertion des échantillons.

5) *Glucose-6-phosphate déshydrogénase* (G-6-PD, EC 1.1.1.49)

Codifié par un seul locus genicus, 6-P*gdh*-A (PHILIPP *et al.* 1979), il est actif seulement dans quelques tissus chez l'adulte, où il montre une seule bande anodique rapide dans l'œil et dans l'encéphale et une bande anodique à migration lente dans le foie et dans le mésonéphros.

6) *Glucose-phosphate-isomérase* (GPI, EC 5.3.1.9)

Cet enzyme est codifié par deux loci genici, G*pi*-A, G*pi*-B (DANDO 1974; PHILIPP *et al.* 1979, 1983; COPPES 1986).

Dans l'œuf vierge et jusqu'au dix-septième jour, seul l'isoenzyme A_2 est actif. Au vingt-cinquième jour, sont déjà décelables les trois isoenzymes A_2, B_2 et AB. Il faut aussi remarquer que dans les tissus de l'adulte, la vitesse de migration de ces isoenzymes est différente de celle des formes larvaires (figs 5 et 6).

DISCUSSION

Chaque phase du cycle vital des différents organismes est sous l'influence d'une série de facteurs en stricte corrélation entre eux, telle l'adaptation au milieu et les modifications métaboliques souvent responsables des principaux caractères morphologiques et biochimiques liés aux espèces.

Pendant le développement, dans les six systèmes enzymatiques étudiés, il a été possible de démontrer l'existence d'une expression génique différenciée, à cause des différentes formes isoenzymatiques originées par l'activité combinée de plusieurs loci genici, seulement dans la LDH, la MDH et la GPI.

Le locus L*dh*-C qui prend son origine d'une mutation du locus L*dh*-B (WHITT 1984) et qui est présent dans le 65% des téléostéens étudiés n'est jamais actif chez la sole.

Les exemplaires les plus jeunes présentent uniquement des formes hétérotétramériques. A partir du dix-septième jour et pendant l'entière période du développement, on peut remarquer l'activation de l'isoenzyme A_2B_2 puis en correspondance de la migration dorsale des yeux et latérale de la bouche, de l'isoenzyme A_3B_1.

La distribution des isoenzymes formés par les deux subunités A et B dans les différents tissus de cette espèce n'est jamais binômiale et dans les stades plus âgés on peut observer une instabilité du premier hétérotétramère décelable pendant le développement (A_2B_2) qui disparaît complètement chez l'adulte.

Ce phénomène est probablement en rapport avec quelques mécanismes génétiques qui contrôlent la synthèse de ces isoenzymes aux différents stades du développement embryonnaire et post-embryonnaire.

Quand la différenciation et le fonctionnement rétinien et de l'articulation maxillo-mandibulaire est complète et le jeune alevin est, du point de vue morphologique, complètement comparable à l'adulte, ces deux isoenzymes montrent leur activité la plus intense.

Le tétramère A_4 qui est prédominant dans les tissus peu oxygénés et B_4 qui, au contraire, est prédominant dans les tissus mieux vascularisés et plus oxygénés, ne sont décelables que chez l'adulte.

Le pattern isoenzymatique de la MDH chez la sole adulte semble être atypique par rapport aux autres espèces de téléostéens étudiés dans lesquelles les isoenzymes A_2 et B_2 sont respectivement prédominants l'un dans le foie et l'autre dans le muscle blanc (WHEAT *et al.* 1973; PHILIPP *et al.* 1979, 1983; PASDAR *et al.* 1984). Chez *Solea vulgaris* en effet, nous avons remarqué que seul l'isoenzyme B_2 est actif dans tous les tissus, tan-

dis que l'isoenzyme A_2 d'origine maternelle n'est plus métaboliquement actif même dans le foie.

Pendant le développement larvaire, les isoenzymes A_2 et Mt augmentent progressivement leur activité jusqu'au quarante-cinquième jour. Par la suite A_2 n'est plus décelable tandis que l'activité de l'isoenzyme Mt reste à peu près au même niveau.

Ce parallélisme d'expression pourrait être en rapport avec une régulation coordonnée de ces deux isoenzymes. L'isoenzyme B_2 ne fait son apparition qu'au dix-septième jour. Néanmoins, il va rester le seul enzyme actif dans les tissus de l'adulte.

En ce qui concerne enfin l'enzyme GPI, les deux isoenzymes étudiés A_2 et B_2 sont respectivement prédominants, comme dans la plupart des téléostéens, dans le foie, l'encéphale, le mésonéphros et dans le muscle blanc (PASDAR *et al.* 1984).

L'isoenzyme B_2 est décelable seulement à partir du vingt-cinquième jour en correspondance à la maturité fonctionnelle du tissu musculaire. Cela aussi montre l'importance du rôle joué par l'enzyme GPI pendant le développement.

La différence de migration chez l'adulte des isoenzymes de la GPI peut être expliqué, soit par un fonctionnement différent des isoenzymes alléliques, soit par un contrôle génique différent des niveaux d'activité tissu-spécifique de l'espèce étudiée ici.

REMERCIEMENTS

Nous désirons remercier Mme E. Zironi pour sa collaboration dans la réalisation de ce manuscrit.

RÉSUMÉ

Nous avons étudié l'évolution du pattern des enzymes ADH, α-GPDH, LDH, MDH, G-6-PD et GPI pendant le développement chez *Solea vulgaris* par moyen d'électrophorèse sur gel d'amidon.

Les différents enzymes ont été mis en évidence avec des colorations histochimiques spécifiques.

Les variations ontogénétiques des différents enzymes dans les tissus sont ici mis en corrélation avec le stade du développement et avec l'activité de régulation, expression et répression génique.

RIASSUNTO

É stata analizzata l'evoluzione dei patterns enzimatici di ADH, α-GPDH, LDH, MDH, G-6-PD e GPI durante le sviluppo in *Solea vulgaris.*

La caratterizzazione biochimica é stata fatta con il metodo elettroforetico sul gel d'amido e gli enzimi sono stati evidenziati con colorazioni istochimiche specifiche.

Le variazioni ontogenetiche, spaziali e temporali, evidenziate sono state correlate con fattori morfologici, metabolici e genetici di regolazione, espressione e repressione.

BIBLIOGRAPHIE

CALLEGARINI, C. 1966. Le emoglobine di alcuni Teleostei nostrani di acqua dolce. *Ric. sci.* 36: 59-64.

CALLEGARINI, C. & D. RICCI. 1973. Lactate dehydrogenase (LDH) isozymes in some species of fresh water, euryhaline and salt water Teleosts from the Po plain and its sea-coast. *Boll. Zool.* 40: 25-30.

COPPES, Z. 1986. Isozymes of glucosephosphate isomerase (PGI) in fishes of see subclass Actinopterygii. *Comp. Biochem. Physiol.* 84B: 575-588.

DANDO, P. R. 1974. Distribution of multiple glucosephosphate isomerase in Teleostean fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 47B: 663-679.

FRANKEL, J. S. 1985. Asynchronous expression of the alcohol and supernatant malate dehydrogenase loci during *Barbus* hybrid development (Cypriniformes, Teleostei). *Comp. Biochem. Physiol.* 81B: 635-639.

GRACY, R. W. 1982. Glucosephosphate and Triosephosphate Isomerases: Significance of Isozyme Structural Differences in Evolution, Physiology and Aging. *Isozymes* 6: 169-205.

PASDAR, M., D. P. PHILIPP, W. A. MOHAMMAD and G. S. WHITT. 1984. Differrences in Tissue Expression of Enzyme Activities in Interspecific Sunfish (Centrarchidae) Hibrids and Their Backcross Progeny. *Biochem. Genet.* 22: 931-956.

PHILIPP, D. P., W. F. CHILDERS and G. S. WHITT. 1979. Evolution of Patterns of Differential Gene Expression: A Comparison of the Temporal and Spatial Patterns of Isozyme Locus Expression in Two Closely Related Fish Species (Northern Largemouth Bass, *Micropterus salmoides salmoides,* and Smallmouth Bass, *Micropterus dolomieui*). *J. exp. Zool.* 210: 473-488.

PHILIPP, D. P., H. R. PARKER and G. S. WHITT. 1983. Evolution of Gene Regulation: Isozymic Analysis of Patterns of Gene Expression During Hybrid Fish Development. *Isozymes* 10: 193-237.

POULIK, M. D. 1957. Starch Gel Electrophoresis in a Discontinuous System of Buffer. *Nature* 180: 1477-1479.

SCANDALIOS, J. S. 1983. Molecular Varieties of Isozymes and Their Role in Studies of Gene Regulation and Expression During Eukaryote Development. *Isozymes* 9: 1-31.

SHAKLEE, J. B., M. J. CHAMPION and G. S. WHITT. 1974. Developmental Genetics of Teleosts: A Biochemical Analysis of Lake Chubsuker Ontogeny. *Devl. Biol.* 38: 356-382.

STAN TSAI, C., L. S. AL-KASSIM, K. P. MITTON, L. E. THOMPSON, C. VAN ES and J. H. WHITE. 1987. Purification and comparative studies of alcohol dehydrogenase. *Comp. Biochem. Physiol.* 87B: 79-85.

SYNER, F. N. and M. GOODMAN. 1966. Polymorphism of Lactate dehydrogenase in *Gelada baboons. Science* 151: 206-208.

WHEAT, T. E., G. S. WHITT and W. F. CHILDERS. 1973. Linkage relationships of six enzyme loci in interspecific sunfish hybrids (genus *Lepomis*). *Genetics* 74: 343-350.

WHITT, G. S. 1970. Developmental genetics of the lactate dehydrogenase isozymes of fish. *J. Exp. Zool.* 175: 1-36.

— 1984. Genetic, developmental and evolutionary aspects of the lactate dehydrogenase isozyme system. *Cell Biochem. and Function* 2: 134-139.